Aus der Hämatologischen Abteilung im Klinikum Steglitz
der Freien Universität Berlin
Leiter: Prof. Dr. med. H. Brücher

STIMULATION DER BLUTLYMPHOZYTEN DURCH UNSPEZIFISCHE STIMULATIEN BEI PATIENTEN MIT LYPHOGRANULOMATOSE UND CHRONISCHER LYMPHATISCHER LEUKÄMIE

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Helmut Scholle
Berlin

1974

Aus der Hämatologischen Abteilung im Klinikum Steglitz
der Freien Universität Berlin
Leiter: Prof. Dr. med. H. Brücher

STIMULATION DER BLUTLYMPHOZYTEN DURCH UNSPEZIFISCHE STIMULATIEN BEI PATIENTEN MIT LYPHOGRANULOMATOSE UND CHRONISCHER LYMPHATISCHER LEUKÄMIE

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Helmut Scholle
Berlin

Referent: Prof. Dr. med. H. Brücher

Korreferent: P r o f . Dr. med. Gerhartz

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 31.10.1974

Druck: Der Präsident der Freien Universität Berlin – Zentrale Universitätsdruckerei V aA 4, 1 Berlin 41

Inhaltsverzeichnis Seite

1	Einleitung		1
2	Material und Methoden		9
	21	Patientengut	9
	22	Kulturansatz	11
	23	Stimulantien	12
	24	DNS-Synthesemessung	12
	25	Bestimmung des Prozentsatzes der Blasten	13
	26	Vitalitätstest	14
	27	Methode des Dichtegradienten	14
	28	Herstellung des Albumingradienten	15
3	Ergebnisse		17
	31	Normalkollektiv	17
	32	Lymphogranulomatose	17
	33	Chronische lymphatische Leukämie	24
	34	Ergebnisse mit Lymphozytensub-populationen	27
4	Diskussion		33
5	Zusammenfassung		40
6	Literaturverzeichnis		42

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546512_0048

1 Einleitung

Kaum ein anderes Gebiet im Bereich der Medizin hat in den letzten Jahren eine ähnlich rasche Entwicklung erfahren wie die Immunologie. Die Fortschritte, die dabei erzielt wurden, sind hauptsächlich auf die Anwendung von in vitro Untersuchungsmodellen zurückzuführen.

Es gilt heute als gesichert, daß die Lymphozyten die zentrale Rolle im komplexen Immungeschehen spielen wie zum Beispiel bei der Allergie vom verzögerten Typ, der Abstoßung homologer Transplantate und bei der graft versus host-Reaktion. Sie stellen die immunologischen "Gedächtniszellen" (memory cells) dar und sind in der Lage, sowohl spezifische Immunreaktionen als auch immunologische Toleranz von einem Individuum auf ein anderes zu übertragen (24).
Wir können zwei Möglichkeiten der Immunantwort in vivo unterscheiden: die humorale Immunantwort und die zelluläre Immunität. Entsprechend ihrer Funktionen erfolgt eine Differenzierung der Lymphozyten in zwei Richtungen. Einerseits differenzieren sich Zellen, die auf die Synthese und Sekretion humoraler Antikörper der verschiedenen Immunglobulinklassen spezialisiert sind, und andererseits kommt es zur Auswahl und Proliferation von Lymphozyten, die für die zelluläre Immunität verantwortlich sind. Zwischen beiden Möglichkeiten der Immunantwort bestehen vielfache Beziehungen, die zum Teil noch unklar sind (41, 60).

Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, daß den beiden

Möglichkeiten der Immunantwort unterschiedliche Lymphozytenpopulationen zuzuordnen sind. Während die Lymphozyten des peripheren Blutes morphologisch im wesentlichen eine einheitliche Zellpopulation zu sein scheinen, lassen sie sich von der Funktion her in Subpopulationen trennen. Dabei sind die sogenannten T-Lymphozyten für die zelluläre Immunität verantwortlich, während die B-Lymphozyten eine wichtige Rolle bei der humoralen Immunantwort spielen (32).

Phylogenetisch geht die Entwicklung der zellulären Immunantwort der Ausbildung des Thymus als isoliertem eigenständigen Organ parallel. In der Ontogenese wandern Zellen pränatal vom Dottersack oder analogen Regionen zur Leber und später ins Knochenmark. Von dort gelangen Stammzellen in den Thymus, wo sie zu immunkompetenten Zellen ausreifen. Dieser Reifungsprozeß geschieht vermutlich unter dem Einfluß eines von den Thymusepithelien gebildeten Hormons, welches als Thymosin bezeichnet wird. Erst die reifen Zellen, die sich vorwiegend in der Medulla des Organs befinden, besiedeln dann die peripheren lymphatischen Gewebe wie z. B. die Milz und die Lymphknoten. Diese Lymphozyten werden als thymusabhängige Lymphozyten (thymus-dependent, thymus-derived) oder T-Zellen bezeichnet. Die T-Lymphozyten sind u. a. dadurch gekennzeichnet, daß sie an ihrer Oberfläche ein Antigen - das sogenannte Theta-Antigen - tragen, was mit Hilfe verschiedener Methoden nachweisbar ist (69).

Die zeitlichen Abläufe der T-Zellreifung und damit die Entwicklung der zellgebundenen Immunantwort sind bei den einzelnen Tierspezies sehr unterschiedlich. Beim Meerschweinchen

z. B. ist diese Entwicklung bereits vor der Geburt abgeschlossen, während bei der Ratte und bei der Maus ihre Ausreifung erst in den ersten Monaten nach der Geburt beendet ist, sodaß bei diesen Tieren eine neonatal durchgeführte Thymektomie die Unterdrückung der zellulären Immunantwort bewirkt.

Auch beim Menschen ist die Rolle des Thymus für die Entwicklung der zellulären Immunität gesichert. Es sind mehrere Krankheitsbilder bekannt, die bei angeborener Thymusaplasie auftreten oder die durch eine gestörte T-Zellfunktion charakterisiert sind (60). Viele in vivo Phänomene, wie zum Beispiel die Transplantatabstoßung und die Hautreaktion auf Antigene als Ausdruck einer Allergie vom verzögerten Typ, sind an eine intakte T-Zellfunktion gekoppelt (18, 40). Daneben scheint auch die Hemmung neoplastischen Wachstums eine T-Zellfunktion zu sein (16). Es ist weiter bekannt, daß die T-Lymphozyten auch bei bestimmten Formen der humoralen Immunantwort eine Funktion in Zusammenarbeit mit B-Lymphozyten zu erfüllen haben (17, 33).

Während die Entwicklung der zellulären Immunität einem bestimmten Organ, dem Thymus, zuzuordnen ist, gilt dies für die Zellen, die die humorale Immunantwort bedingen, nicht in gleicher Weise. Nur bei den Vögeln ist ein eigenständiges Organ bekannt, die sogenannte Bursa Fabricii, in der die Ausreifung der B-Lymphozyten (bursa derived) stattfindet. Die Bedeutung der Bursa bei Vögeln wird durch Befunde demonstriert, die an neonatal bursektomierten Tieren erhoben wurden. Bei auf diese Weise behandelten Tieren fehlt die humorale Immunantwort, es

werden dann keine Immunglobuline synthetisiert, während andererseits die zelluläre Immunität nicht beeinträchtigt ist (36).
Bei den Säugetieren einschließlich des Menschen konnte ein bursa-äquivalentes Organ bisher nicht nachgewiesen werden. Hier scheinen die Lymphozyten, die B-Zellfunktionen haben, direkt im Knochenmark oder im peripheren lymphatischen Gewebe auszureifen. Sie werden auch als dem Knochenmark entstammende, bursa-äquivalente (bone marrow derived) Zellen bezeichnet. Gekennzeichnet sind diese Zellen u. a. durch den Nachweis von Immunglobulinen an den Zelloberflächen (23, 48, 52). Bei Menschen sind diese B-Lymphozyten ebenfalls für die Synthese der verschiedenen Immunglobuline verantwortlich.
Auch hier sind eine Reihe zum Teil angeborener Erkrankungen bekannt, die auf eine gestörte B-Zellfunktion zurückzuführen sind (60).

Als ein in vitro-Modell, das hervorragend geeignet ist, die Funktionen der Lymphozyten zu untersuchen, kann die Kultivierung und Stimulierung der Lymphozyten angesehen werden. Noch bis zum Jahre 1960 vertrat man die Ansicht, daß es sich bei den Blutlymphozyten um Endformen handelt, die weder in vivo noch in vitro zu einer Proliferation fähig sind (70). Nowell konnte jedoch zeigen, daß menschliche Blutlymphozyten in vitro unter dem Einfluß von Phytohämagglutinin, einem Protein aus einer Bohnenart (Phaseolus vulgaris), in teilungsfähige blastenähnliche Zellen umgewandelt werden (43).

Bei der Lymphozytentransformation in vitro werden eine Reihe

entscheidender morphologischer und biochemischer Veränderungen induziert, wobei in den Zellen, die sich primär in der G 1-Phase des Zellteilungszyklus befinden, alle die Vorgänge ablaufen, die über die DNS-Synthesephase zur Mitose führen (Übersicht bei 39, 42).
Damit liefert die Lymphozytenstimulation ein in vitro-Modell, mit dessen Hilfe Kontrollmechanismen der DNS-Synthese und der Mitose untersucht werden können. Außerdem hat sich gezeigt, daß sich mit diesem Modell auch funktionelle Unterschiede zwischen den einzelnen Lymphozytenpopulationen untersuchen lassen (32).

Morphologisch ist die Lymphozytentransformation durch das Auftreten von Mitosefiguren und sogenannter Blasten gekennzeichnet. Diese Blasten haben ein stark basophiles, vakuolisiertes Zytoplasma, sowie einen vergrößerten Zellkern mit locker strukturiertem Chromatin und meist mehreren Nukleolen (71). Derartige Blasten treten in unbehandelten Kulturen äußerst selten auf, während sie in stimulierten Kulturen einen unterschiedlich hohen Anteil an der Gesamtpopulation ausmachen.
Die morphologische Auswertung und Auszählung der blastenähnlichen Zellen stellt eine Möglichkeit dar, die Lymphozytentransformation zu untersuchen. Zur quantitativen Bestimmung des Ausmaßes der Transformation hat sich dagegen in den letzten Jahren die DNS-Synthesemessung mit Hilfe radioaktiven Thymidins oder Cytidins als die verläßlichere Methode durchgesetzt.

Seit der Entdeckung Nowells über die Wirkung des Phytohämagglutinins wurden in den letzten Jahren eine Reihe weiterer Substanzen gefunden, die eine ähnliche Wirkung auf Lymphozyten in vitro haben. Diese Substanzen können unterteilt werden in sogenannte unspezifische Stimulantien, die in der Lage sind, Lymphozyten einer jeden Versuchsperson zu stimulieren, ohne daß eine vorherige Sensibilisierung des betreffenden Menschen durch diese Substanz stattgefunden hat. Zu dieser Gruppe gehören die sogenannten Phytomitogene wie Phytohämagglutinin (PHA), Concanavalin A und Pokeweed mitogen (11, 12, 39, 49). Davon zu unterscheiden sind die spezifischen Stimulantien, die nur Lymphozyten von vorher spezifisch sensibilisierten Versuchspersonen zu transformieren vermögen, z. B. Tuberkulin (PPD) und Tetanus-Toxoid (20, 46). Auch die sogenannte mixed culture reaction gehört in diese Gruppe, da bei dieser Reaktion die Transformation durch Zellen eines zweiten Spenders erfolgt, die unterschiedliche Histokompatibilitätsantigene aufweisen (9, 10).

Neben der bereits bekannten stimulierenden Wirkung von bestimmten Quecksilberverbindungen (63) konnte kürzlich gezeigt werden, daß auch Zinksalze in der Lage sind, menschliche Blutlymphozyten unspezifisch zu transformieren (37, 59).

Da der Wirkungsmodus der Lymphozytentransformation noch weitgehend unbekannt ist, schien eine genauere Untersuchung der Zinkstimulation sinnvoll zu sein. Die Bedeutung des Zinkmechanismus für die Lymphozytentransformation erscheint um so größer, da Zinkverbindungen verglichen mit anderen Stimulantien eine einfache chemische Struktur haben, und zudem ist es

die erste Substanz mit stimulierender Wirkung, die physiologisch im Körper in relativ großen Mengen vorhanden ist. Zn^{2+} ist für die Funktion vieler Enzyme notwendig, ansonsten ist seine biologische Wirkungsweise in vivo bisher noch weitgehend unbekannt (50). Die Befunde einiger Autoren mit verschiedenen Versuchsmodellen lassen jedoch vermuten, daß Zn^{2+} eine bedeutende Rolle im DNS-Stoffwechsel spielt (5, 67, 68).

Seitdem die Rolle der menschlichen Lymphozyten für die Ausbildung der Immunantwort bekannt ist, konnten eine Reihe von Krankheitsbildern beschrieben werden, die mit einer Störung der Lymphozytenfunktionen einhergehen. Hierzu gehören Erkrankungen mit angeborenen immunologischen Defekten wie z. B. das DiGeorge-Syndrom, die Ataxia telangiectasia und das Wiscott-Aldrich-Syndrom. Bei diesen Erkrankungen können sowohl die T-Zell-abhängigen oder die B-Zell-abhängigen Funktionen beeinträchtigt sein, als auch Störungen in beiden Systemen kombiniert vorkommen (Übersicht bei 60). Zu den Erkrankungen mit erworbenen Immundefekten gehören vor allem lymphoproliferative Erkrankungen wie z. B. die Lymphogranulomatose, die chronische lymphatische Leukämie und die Sarkomatosen. Bei diesen Krankheiten scheinen in erster Linie die T-Zell-abhängigen Funktionen (Allergie vom verzögerten Typ, Abstoßung homologer Hauttransplantate) beeinträchtigt zu sein (2, 3, 34), bei der chronischen lymphatischen Leukämie sind allerdings auch häufig Veränderungen der humoralen Immunantwort zu finden.

Es konnte mehrfach gezeigt werden, daß die durch PHA induzierte Lymphozytentransformation in vitro bei Patienten mit einer

Lymphogranulomatose oder einer chronischen lymphatischen Leukämie herabgesetzt ist (13, 28, 29, 30, 34, 44, 56, 61, 64). Da heute als sicher gelten kann, daß PHA ausschließlich T-Zellen zu transformieren vermag (32), scheint dieser veränderten Transformierbarkeit ein Defekt der T-Zellen zugrunde zu liegen.

Ziel dieser Arbeit sollte es sein, die Transformation der Blutlymphozyten durch Zinksalze bei Patienten mit hämatologischen Systemerkrankungen zu untersuchen. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob eine Trennung der Lymphozyten nach ihrer spezifischen Dichte zu Subpopulationen führt, die funktionelle Unterschiede aufweisen.

2 Material und Methoden

21 Patientengut

Es wurden von uns 28 poliklinische bzw. stationäre Patienten mit einer Lymphogranulomatose im Alter von 20 bis 74 Jahren untersucht. Die Diagnose war in jedem Fall durch zytologische und/oder histologische Untersuchung gesichert. Eine Stadieneinteilung bei den Patienten erfolgte nach dem heute allgemein anerkannten Schema (58). Fünf Patienten hatten zu keinem Zeitpunkt eine spezifische zytostatische und/oder radiologische Therapie erhalten. Die übrigen 23 Patienten waren entweder zytostatisch vorbehandelt, oder es war bei ihnen eine Bestrahlungs-Behandlung durchgeführt worden. Die zuletzt durchgeführte Therapie lag bei diesen Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung mindestens 4 Wochen zurück.

Die Tabelle I gibt einen Überblick über unser Patientengut im Hinblick auf das Erkrankungsstadium. Fünfzehn Patienten befanden sich nach klinischen, hämatologischen und radiologischen Symptomen in Remission, während 13 Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung ein aktives Stadium der Erkrankung aufwiesen.

Tabelle I

Einteilung der Patienten mit Lymphogranulomatose im Hinblick auf das Erkrankungsstadium

Stadium	Zahl der Patienten	
	in Remission[1]	aktives Stadium
I	3	-
II	5	3
III	7	9
IV	-	1
Total	15	13

[1] Die Zuordnung in die Stadien I - IV bei den Patienten, die sich als Folge der Therapie in Remission befanden, erfolgte nach den vor dieser Therapie bestehenden Kriterien.

Wir untersuchten weiterhin 27 Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie im Alter von 55 bis 81 Jahren, bei denen zum Zeitpunkt der Untersuchung keine Therapie durchgeführt wurde. Die letzte spezifische Behandlung lag mindestens 2 Monate zurück. Die Leukozytenzahlen lagen bei 21 Patienten zwischen 10.000 und 100.000/mm^3. Nur 6 Patienten hatten über 100.000/mm^3 Leukozyten. Als Kontrollkollektiv dienten 23 gesunde Versuchspersonen. Vor jeder Untersuchung wurden bei allen Patienten und Normalpersonen die wichtigsten hämatologischen Daten bestimmt.

22 Kulturansatz

Wir verwendeten heparinisiertes Venenblut (10 IE/ml Liquemin^{R}-Roche), das im Verhältnis 1:10 mit 6 %igem Dextran (Macrodex^{R}-Knoll) vermischt wurde. Nach einer Sedimentation von 1 Stunde bei 37° C konnte der leukozytenreiche Überstand abpipettiert werden und anschließend wurde durch Zentrifugation bei 1000 U/Min. für 10 Minuten Plasma gewonnen. Aufgenommen in Hanks-Solution (Biocult) wurden die Zellen dann zweimal gewaschen und so gereinigt in Kulturmedium aufgenommen.
Die Anzahl der Zellen pro mm^3 wurde in einem elektronischen Partikelzählgerät (Coulter Counter, Modell S) bestimmt. Als Kulturmedium verwandten wir in allen Versuchen Minimal Essential Medium Eagle (MEM, Flow Lab.). Der normale Kulturansatz von 3 ml enthielt 1,0 x 10^6 Leukozyten/ml sowie 30 % autologes Plasma, 2 mMol/ml L-Glutamin (Flow Lab.), 100 IE/ml Penicillin (Flow Lab.) sowie 100 ug/ml Streptomycin (Flow Lab.).

In einigen Experimenten wurde anstelle des autologen Plasmas blutgruppengleiches homologes Plasma verwandt. Ferner wurden Versuche durchgeführt, in denen die Zellkonzentration im Ansatz bis zu 10 x 10^6 Zellen/ml betrug.

Die Zellen wurden in 16 x 125 mm großen Plastikröhrchen (Falcon) bei 37° C in einem mit Luft und 5 % CO_2 begasten Brutschrank inkubiert. Die Kulturdauer betrug in der Regel 144 Stunden. In einigen Versuchen wurden die Zellen bis zu 240 Stunden inkubiert. Es wurden jeweils 4-fach Ansätze angelegt, wovon 3 Kulturen zur Messung der DNS-Synthese entsprechend

aufgearbeitet wurden. Von einem Kulturansatz wurden Ausstriche angefertigt und nach Pappenheim gefärbt. Die Kontrollansätze ohne Zusatz eines Stimulans wurden entsprechend ausgewertet.

23 Stimulantien

Als Stimulans wurde in den meisten Versuchsreihen $ZnCl_2$ (pro analysi, Merck) verwandt. Das $ZnCl_2$ wurde in 9,5 Teilen 0,9 %iger NaCl und 0,5 Teilen 0,1 N HCl gelöst und anschließend steril filtriert.

Das Stimulans wurde in Aliquots von 0,1 ml zu Versuchsbeginn der Kultur zugesetzt. Es wurden in jedem Experiment mindestens drei Zinkkonzentrationen getestet (2,5; 3,0 und 3,5 x 10^{-4} M) und in der Auswertung jeweils der höchste Stimulationswert berücksichtigt. In einigen Versuchen verwandten wir Phytohämagglutinin (PHA P, Difco) als Stimulans. In diesen Fällen betrug die Inkubationszeit gemäß dem Wirkungsoptimum von PHA 72 Stunden.

24 DNS-Synthesemessung

Als Parameter der DNS-Synthese diente die Messung des Einbaues von ^{3}H-Thymidin (^{3}H-TdR) in die säureunlösliche Fraktion. Die Kulturen erhielten dazu je 2 uCi ^{3}H-TdR (spezifische Aktivität 2 Ci/mM - Radiochemical Centre Amersham) während der letzten vier Stunden der Inkubationszeit. Anschließend wurden die Röhrchen in ein Eisbad gestellt, um die DNS-Synthese und damit den Einbau von ^{3}H-TdR zu stoppen. Sie wurden dann nacheinander in 4 ml gekühlter 0,9 %iger Kochsalzlösung (zweimal), in 2 ml

gekühlter 5 %iger Trichloressigsäurelösung (zweimal) und in 2 ml gekühltem absoluten Äthylalkohol (einmal) gewaschen (Zentrifugation 10 Minuten bei 4° C und 1000 g). Das Sediment wurde während 45 Minuten bei 60° C in Hyamine (Packard) gelöst. Der Inhalt des Kulturröhrchens wurde mit 3 x 5 ml Szintillationsflüssigkeit (100 g Naphtalin (Merck), 7 g PPO (Merck), 0,3 g POPOP (Packard) auf 950 ml Dioxan) in Probengläschen überführt. Diese wurden in einem Tricarb-Szintillationsspektrometer Modell 3380 (Packard) dreimal fünf Minuten unter Verwendung eines automatischen externen Standards gemessen.
Die Ergebnisse werden als mittlere Impulszahl/Kultur/Minute (cpm) von Dreifachkulturen angegeben. Der Quench-Effekt war wegen der stets gleichen Versuchsbedingungen immer konstant (30 % Zählausbeute).
Außerdem wurde ein Stimulationsindex nach folgender Formel bestimmt:

$$SI = \frac{\text{mittlere cpm in } Zn^{2+} \text{ behandelten Kulturen}}{\text{mittlere cpm in unbehandelten Kulturen}}$$

25 Bestimmung des Prozentsatzes der Blasten

Parallel zur Messung der DNS-Synthese wurde jeweils aus einem Kulturansatz der Prozentsatz blastenähnlicher Zellen bestimmt. Dazu wurden am Ende der Inkubationszeit die Kulturen 10 Minuten bei 1000 U/Min. zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und vom Zellsediment Ausstrichpräparate angefertigt. Diese Ausstriche wurden nach Pappenheim gefärbt und der Prozentsatz der blastenähnlichen Zellen durch Auszählung von 1000 mononu-

kleären Zellen bestimmt.

26 Vitalitätstest

Vitalitätsuntersuchungen führten wir nach der von Turk et al. (66) angegebenen Methode (Trypanblau-Test) durch.
Dabei wurden die Zellen am Ende der Kulturzeit 15 Minuten bei 37° C in einer 0,1 %igen Trypanblau-Lösung (Chroma) inkubiert. Der Prozentsatz der blau gefärbten Zellen - entsprechend den nicht vitalen Zellen - wurde anschließend durch Auszählung von 100 Zellen in der Zählkammer bestimmt.

27 Methode des Dichtegradienten

Bei acht Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie, die zum Zeitpunkt der Versuche keine zytostatische Therapie erhielten, wurden die Zellen aus dem peripheren Blut entsprechend ihrer spezifischen Dichte getrennt. Als Kontrollgruppe dienten acht gesunde Versuchspersonen.
Zur Isolierung von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut der Normalpersonen benutzten wir Glassäulen (30 x 1 cm) mit Wärmemantel, die mit Nylonfasern (Fenwal Corporation, Morton's Grove, Illinois) unter sterilen Bedingungen gestopft waren. Die Inkubation von etwa 30 Minuten wurde bei 37° C durchgeführt. Nach einer anschließenden 60minütigen Sedimentation bei 37° C unter Zusatz von 6 %igem Dextran (Macrodex^{R}-Knoll, Molekulargewicht 60 000; im Verhältnis 1:10) wurde der leukozytenreiche Überstand gewonnen (15, 45, 51). In den so gewonnenen Zellsuspensionen lag der Lymphozytenanteil zwischen

95 und 99 %.

Bei den Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie wurde auf ein solches Vorgehen verzichtet, da hier der Prozentsatz der Lymphozyten im peripheren Blut größer als 95 % war. Der zellreiche Überstand wurde durch Sedimentation mit Dextran gewonnen.

28 Herstellung des Albumingradienten

Wir hielten uns bei der Herstellung der Gradienten im wesentlichen an die von Raidt und Mitarbeiter (53) und Rieber (54) angegebenen Methoden. Ausgehend von einer 35 %igen sterilen, isotonen Rinderalbuminlösung (Biotest, spezifische Dichte 1,10 g/cm^3, pH-Wert 7,1) wurden mit Hilfe einer Elektrolytlösung (Dichte 1,0 g/cm^3, Biotest) folgende Albuminlösungen hergestellt:

32 % (Dichte 1,091 g/cm^3)
29 % (Dichte 1,083 g/cm^3)
26 % (Dichte 1,074 g/cm^3)
23 % (Dichte 1,066 g/cm^3)

In 12 x 100 mm großen silikonisierten Zentrifugengläsern wurde der Gradient so aufgebaut, daß auf 2 ml 35 %iges Albumin die anderen Albuminlösungen in der Folge 32 - 29 - 26 und 23 %ige Lösung aufgeschichtet wurden. Jeweils 1 ml Zellsuspension (ca. 1 x 10^8 mononukleäre Zellen/ml) wurde auf einen Albumingradienten geschichtet.

Die Gläser wurden dann für 30 Minuten bei 3000 g zentrifugiert. Anschließend konnten die Zellen mit Hilfe einer Pasteur-Pipet-

te von den Grenzschichten abgehebert werden. Die Zellen wurden zweimal mit Kulturmedium gewaschen, und anschließend legten wir 3-fach Kulturen nach oben beschriebener Methode an. Als Stimulans wurde den Kulturen PHA zugesetzt und die Inkubationszeit auf 72 Stunden begrenzt.

Von jeder Lymphozytenfraktion wurden Ausstriche angefertigt und außerdem die absoluten Zellzahlen mit dem Coulter Counter bestimmt.

In einigen Versuchen wurden nach einer ersten Trennung über den Gradienten die Lymphozyten einzelner Dichteklassen vermischt und erneut über einen zweiten identisch aufgebauten Albumingradienten getrennt. Hierdurch sollte geprüft werden, ob die Verteilung reproduzierbar ist.

3 Ergebnisse

31 Normalkollektiv

Vorversuche haben gezeigt, daß das Maximum der Stimulation mit Zn^{2+} gemessen am ^{3}H-TdR-Einbau und am Prozentsatz der blastenähnlichen Zellen nach 144 Stunden Kulturdauer erreicht wurde. Die optimale Zn^{2+}-Konzentration betrug in der Regel $3{,}0 \times 10^{-4}$ Mol/ml Kulturansatz (37, 59). Wie die Abbildung I zeigt, betrug die mittlere ^{3}H-TdR-Einbaurate bei den von uns untersuchten Normalpersonen 143.000 cpm. Die Werte schwankten zwischen 22.201 und 229.256 cpm.
Eine gleich breite Streuung fand sich bei der Bestimmung des Prozentsatzes der blastenähnlichen Zellen (11,8 - 53,6 %) (Abbildung II).
Die Prüfung auf Vitalität der Zellen hat gezeigt, daß der Prozentsatz gefärbter Zellen bei der Trypanblau-Methode weder in den Kontrollkulturen noch in den Zn^{2+}-stimulierten Kulturen höher als 10 % war.

32 Lymphogranulomatose

Die Ergebnisse bei den von uns untersuchten Patienten mit Lymphogranulomatose sind ebenfalls in den Abbildungen I + II dargestellt. Es zeigte sich, daß die Stimulationsfähigkeit der Blutlymphozyten durch Zn^{2+} verglichen mit dem Normalkollektiv deutlich eingeschränkt war. Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($2p < 0{,}01$, Wilcoxon-Test). Der ^{3}H-TdR-Einbau als Maß für die DNS-Synthese betrug im Mittel-

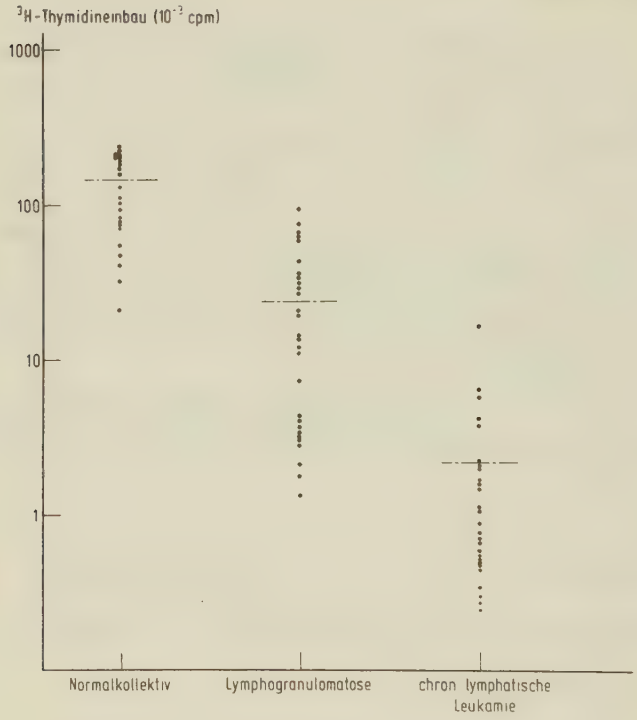

Abb. I: Zinkstimulation peripherer Lymphozyten bei gesunden Kontrollpersonen, Patienten mit Lymphogranulomatose und chronischer lymphatischer Leukämie (^{3}H-Thymidin-Einbau nach 144 Stunden). Jeder Punkt repräsentiert eine Versuchsperson, die Horizontallinien geben die Mittelwerte an.

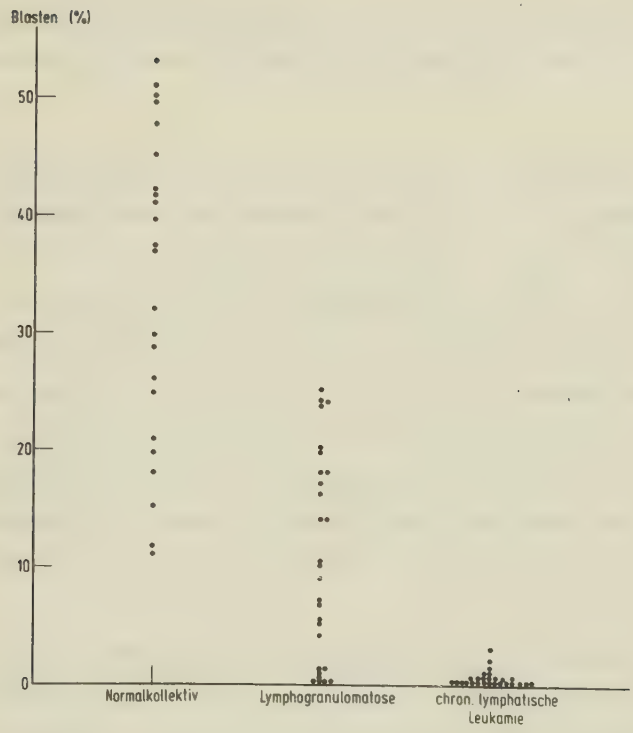

Abb. II: Prozentsatz blastenartiger Zellen in zinkstimulierten Lymphozytenkulturen (144 Stunden) bei gesunden Versuchspersonen, Patienten mit Lymphogranulomatose und chronischer lymphatischer Leukämie. Die Werte der unbehandelten Kontrollkulturen lagen bei allen 3 Gruppen unter 0,1 %.

wert 12.381 cpm bei einer Schwankungsbreite von 1.343 und 94.124 cpm.
Parallel dazu fand sich auch eine deutliche Verminderung des Prozentsatzes der blastenähnlichen Zellen (zwischen 0,0 und 24,3 %).

Wie die Abbildung III zeigt, war das Ausmaß der Stimulation davon abhängig, ob sich die Patienten in Remission oder in einem aktiven Stadium der Erkrankung befanden.
Die Patienten, die sich in Remission befanden, wiesen einen höheren Stimulationsindex auf als jene in einem aktiven Stadium der Erkrankung. Dies zeigt sich sowohl bei der Messung der DNS-Synthese als auch bei der Auszählung der Blasten. Die Stimulation bei Patienten in Remission lag aber noch deutlich unter der von gesunden Versuchspersonen, obwohl in einzelnen Fällen durchaus ein normaler Stimulationsindex gefunden wurde.
Um zu untersuchen, ob die verminderte Stimulationsfähigkeit auf die bei den Lymphogranulomatosepatienten häufig zu findende Lymphopenie zurückzuführen ist, wurde die Abhängigkeit des ^{3}H-TdR-Einbaus in vitro von den absoluten Lymphozytenwerten des peripheren Blutes bei diesen Patienten bestimmt. Wie aus der Abbildung IV hervorgeht, fanden wir in unserem Patientenkollektiv keine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Zinkstimulation und dem absoluten Lymphozytenanteil im peripheren Blut.
Um den Einfluß von Plasmafaktoren auf die Lymphozytenstimulation zu untersuchen, wurden in einer Serie von Experimenten

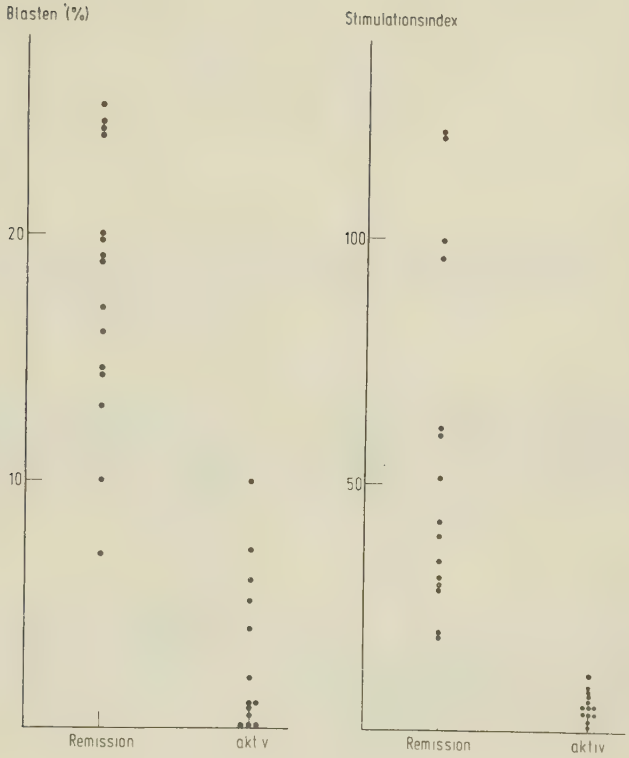

Abb. III: Zinkstimulation der peripheren Lymphozyten bei Patienten mit Lymphogranulomatose (^{3}H-Thymidin-Einbau und Prozentsatz Blasten). Gegenübergestellt sind Patienten in Remission und einem aktiven Erkrankungsstadium.

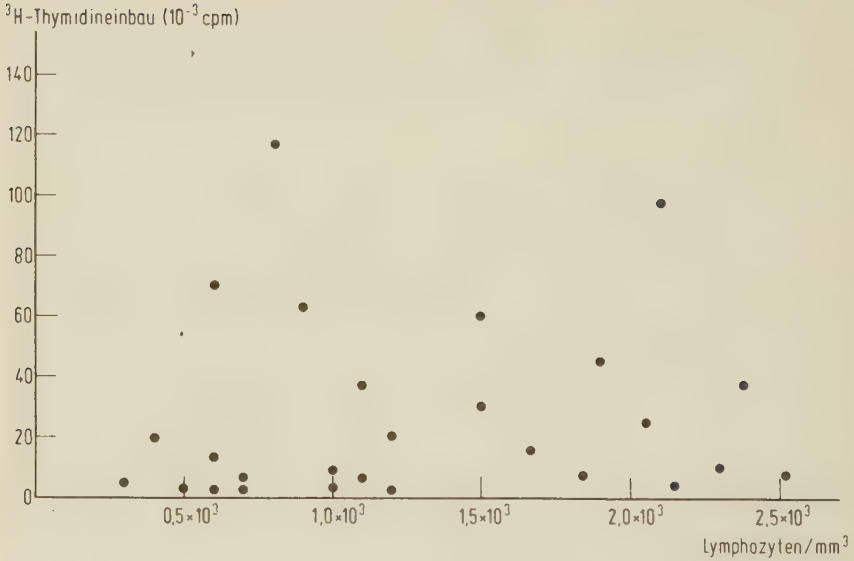

Abb. IV: Abhängigkeit der Zinkstimulation in vitro von den absoluten Lymphozytenwerten des peripheren Blutes bei Patienten mit Lymphogranulomatose.

Zellen von Lymphogranulomatosepatienten einmal in autologem Plasma und parallel dazu in blutgruppengleichem Plasma gesunder Versuchspersonen kultiviert. Außerdem wurden Zellen gesunder Kontrollpersonen in autologem Plasma und zum Vergleich im Plasma von Lymphogranulomatosepatienten kultiviert.

Tabelle II

Vergleich der Zinkstimulation bei Verwendung von autologem Plasma und homologem Plasma Gesunder. Der ^{3}H-TdR-Einbau wurde nach 144 Stunden gemessen, angegeben sind mittlere cpm von Dreifachkulturen

Lymphogranulomatose		Chron. lymphat. Leukämie	
Eigenplasma	Normalplasma	Eigenplasma	Normalplasma
43.684	41.002	325	470
416	387	23.718	29.977
36.015	43.365	1.175	1.084
20.168	27.465	589	1.135
559	535	1.739	3.501

Die dargestellten typischen Beispiele der Tabelle II belegen, daß bei den fünf von uns untersuchten Patienten das Plasma keine zytotoxischen Eigenschaften aufwies. Die Stimulationsfähigkeit der Patientenlymphozyten konnte durch Kultivierung in Normalplasma nicht verbessert werden, andererseits blieb, wie Kontrollversuche zeigten, die Stimulationsfähigkeit der Lymphozyten von Normalpersonen auch bei Inkubation in Patientenplasma erhalten.

33 Chronische lymphatische Leukämie

Die Unterschiede in der Transformationsfähigkeit der Lymphozyten im Vergleich zum Normalkollektiv waren bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie noch größer als bei den Lymphogranulomatosepatienten (Abbildungen I + II). Der Unterschied war signifikant ($2p < 0{,}01$, Wilcoxon-Test). Der ^{3}H-TdR-Einbau und der Prozentsatz blastenähnlicher Zellen war in Zinkkulturen kaum höher als in unbehandelten Kontrollkulturen, wenn im Ansatz eine Zelldichte von $1{,}0 \times 10^6$ Leukozyten/ml bestand. Der durchschnittliche ^{3}H-TdR-Einbau lag bei 1.384 cpm.

Wie aus der Abbildung V hervorgeht, bestand bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie eine deutliche Abhängigkeit der Zinkstimulation von der Zelldichte im Kulturansatz. Bei allen fünf von uns untersuchten Patienten konnte der Stimulationsindex durch Erhöhung der Zellzahl im Kulturansatz erheblich gesteigert werden, ohne allerdings Normalwerte zu erreichen. Das Optimum der Stimulation wurde bei Kulturen mit $3 - 5 \times 10^6$ Lymphozyten/ml erzielt, das heißt mit einer Zelldichte, die bei gesunden Versuchspersonen bereits suboptimal ist (7).

Wie die Abbildung VI zeigt, lag das Optimum der in vitro-Stimulation durch Zn^{2+} für gesunde Versuchspersonen bei einer Kulturdauer von 7 Tagen. Die Stimulation bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie konnte auch durch eine Verlängerung der Inkubationszeit bis zu 10 Tagen nicht erhöht werden.

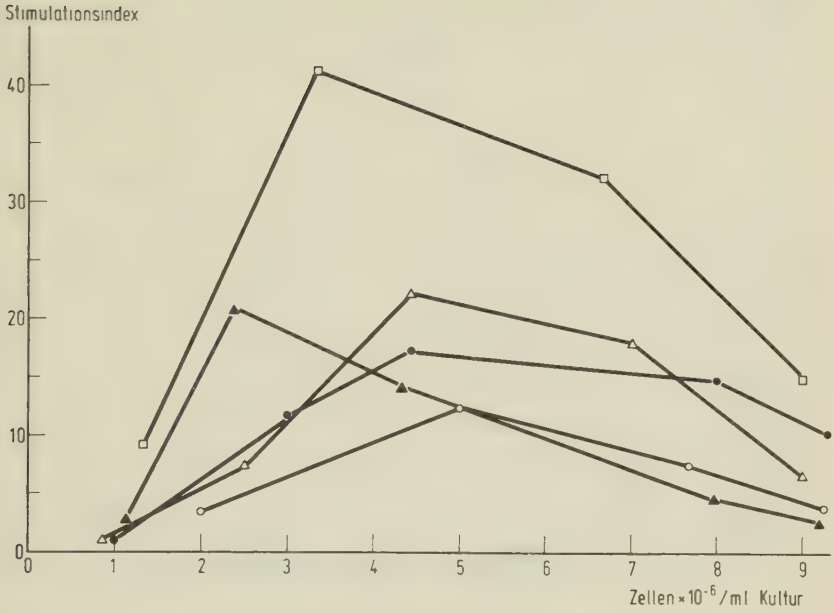

Abb. V: Zinkstimulation bei chronischer lymphatischer Leukämie in Abhängigkeit von der Zelldichte des Kulturansatzes. Dargestellt sind 5 Versuche mit 5 verschiedenen Patienten.

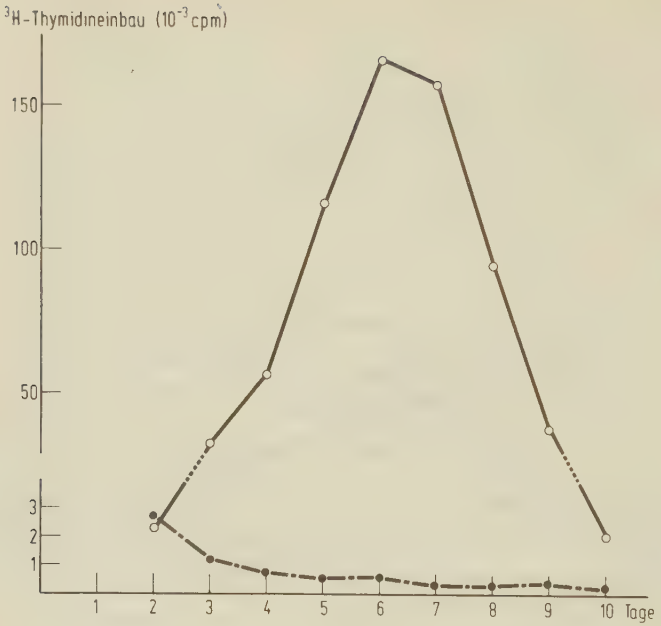

Abb. VI: In vitro-Stimulation der peripheren Lymphozyten durch Zn^{2+} bei einem Gesunden (o) und einem Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (•). Der ^{3}H-Thymidin-Einbau wurde in 24stündigen Abständen gemessen.

Ein hemmender Einfluß von Plasmafaktoren auf die Stimulationsfähigkeit der Lymphozyten bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie konnte nicht nachgewiesen werden (Tabelle II).

34 Ergebnisse mit Lymphozytensubpopulationen

Wie die Tabelle III zeigt, schwankte die prozentuale Verteilung der Lymphozyten in den einzelnen Dichteklassen in einem weiten Bereich. Sowohl bei den Patienten als auch bei den Kontrollpersonen fanden sich die meisten Zellen in den Klassen 29 und 32. Nur bei zwei Patienten konnten mit den Lymphozyten der Dichteklasse 23 Kulturen angelegt werden; die Zellausbeute bei allen anderen Versuchspersonen war so gering, daß keine Kulturen angelegt werden konnten.

Tabelle III

Verteilung der Zellen auf die einzelnen Dichteklassen bei acht Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie und bei acht gesunden Versuchspersonen

	Prozentsatz gewonnener Zellen				
	23	26	29	32	35
Normalpersonen	2,1 (1-5)	17,1 (6-31)	50,5 (32-68)	22,8 (6-44)	7,6 (2-14)
Patienten mit CLL	1,7 (1-6)	12,8 (3-31)	41,6 (24-61)	33,4 (5-58)	11,6 (2-31)

Die wiederholte Trennung der aus einzelnen Dichteklassen gewonnenen Lymphozyten über einen zweiten identisch aufgebauten Albumingradienten zeigte eine quantitativ entsprechende Verteilung der Lymphozytenfraktionen, wie bei der ersten Schichtung über den Gradienten.

Morphologisch, aber auch in bezug auf die Vitalität, ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Lymphozytenklassen. Der Prozentsatz Trypanblau-gefärbter Zellen bei den gesunden Versuchspersonen war nie größer als 10 %, während bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie in einigen Fällen bis zu 20 % toter Zellen gefunden wurden.

Erwartungsgemäß war die Stimulationsrate in den Lymphozytenkulturen von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie gegenüber dem Normalkollektiv deutlich reduziert.

Bei optimalen PHA-Konzentrationen lag der Stimulationsindex für die gesunden Versuchspersonen zwischen 19 und 190 (Tabelle IV), für das Patientenkollektiv zwischen 3 und 20 (Tabelle V).

Tabelle IV

PHA-Stimulation peripherer Lymphozyten bei acht gesunden Versuchspersonen

Spender	Gesamtpopulation[1]	Dichteklassen[2] 23	26	29	32	35
W. L.	140	-	1,0	0,9	0,5	0,4
E. J.	172	-	0,3	0,2	0,2	0,5
A. H.	152	-	0,7	0,5	1,0	-
G. B.	77	-	0,7	1,1	0,8	-
H. R.	190	-	0,7	0,3	0,8	-
W. S.	19	-	1,4	0,9	1,0	0,2
M. P.	51	-	1,3	1,1	0,8	0,9
E. M.	77	-	0,5	0,9	1,1	1,0

[1] Stimulationsindex in der Gesamtzellsuspension.

[2] Steigerungsrate in den einzelnen Dichteklassen gegenüber dem Stimulationsindex der Gesamtzellsuspension.

Tabelle V

PHA-Stimulation peripherer Lymphozyten bei acht Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie

Spender	Gesamtpopulation[3]	Dichteklassen[4] 23	26	29	32	35
M. J.	5	-	1,6	0,6	0,2	-
A. S.	3	2,3	1,3	1,0	0,3	-
D. M.	17	0,2	1,0	2,5	1,0	-
G. C.	7	-	2,8	0,5	0,3	0,2
W. R.	20	-	2,5	1,1	0,6	0,2
A. W.	15	-	3,1	1,2	0,7	0,2
R. M.	9	-	1,5	1,0	1,1	0,8
J. A.	7	-	2,4	1,1	0,4	-

[3] Stimulation in der Gesamtzellsuspension.

[4] Steigerungsrate in den einzelnen Dichteklassen gegenüber dem Stimulationsindex der Gesamtzellsuspension.

Wie aus der Tabelle IV hervorgeht, erbrachte die Fraktionierung der Lymphozyten über einen diskontinuierlichen Dichtegradienten bei der Kontrollgruppe keine Zellpopulation, die erheblich besser stimulierbar war als die Gesamtpopulation. Es wurde zwar in den mit PHA-stimulierten Kulturen mit den Zellen der Dichteklassen 26 und 29 ein erhöhter ^{3}H-TdR-Einbau gemessen, doch war auch gerade bei diesen Zellen die spontane Thymidininkorporation gegenüber der Gesamtpopulation deutlich erhöht. Aus diesem Grunde war der Stimulationsindex nur etwa gleich dem der Gesamtpopulation (Tabelle VI).

Tabelle VI

PHA-Stimulation peripherer Lymphozyten bei einer gesunden Versuchsperson und einem Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie. Gegenübergestellt sind Kontrollwert in unbehandelten Kulturen, Stimulation in PHA-Kulturen und Stimulationsindex.

	Gesamtpopulation	Dichteklassen 23	26	29	32	35
CLL-Pat.						
Kontr.[5]	316	-	443	377	441	340
PHA[5]	2.468	-	8.682	1.262	1.321	480
SI	7	-	19	3	3	1
Normalperson						
Kontr.[5]	940	-	2.135	1.442	1.112	-
PHA[5]	72.365	-	115.290	121.073	67.832	-
SI	77	-	54	84	61	-

[5] Mittlere cpm von Dreifachkulturen.

Bei allen untersuchten Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie dagegen wurden mit den Lymphozytenpopulationen 26 oder 29 erheblich größere Stimulationsindices erreicht als mit der Gesamtpopulation (Tabelle V).

In einem Fall wurde für die Dichteklasse 26 in bezug auf die Ausgangspopulation ein dreimal größerer Stimulationsindex gefunden. Dagegen lagen die Werte für die Klassen größerer Dichte (Dichteklassen 32 und 35) unter denen der Gesamtpopulation (Tabelle VI).

Trotz der verbesserten Stimulationsrate mit den Subpopulationen geringerer Dichte wurden aber nicht gleich hohe Werte für den ^{3}H-TdR-Einbau erzielt wie mit Lymphozyten von gesunden Versuchspersonen.

4 Diskussion

Die Messung der Stimulation menschlicher Blutlymphozyten unter der Einwirkung mitogener Substanzen gilt heute allgemein als eine Methode, die immunologische Kompetenz dieser Zellen in vitro zu untersuchen. Die bei einigen lymphoproliferativen Erkrankungen mit Hilfe anderer Methoden festgestellten immunologischen Defekte finden ihre Ergänzung in den Ergebnissen, die die stimulierte Lymphozytenkultur aufweist.

Die von uns im Modell der Zn^{2+}-stimulierten Lymphozytenkultur gefundenen Ergebnisse stehen in Übereinklang mit den Befunden anderer Untersucher mit anderen Mitogenen (13, 25, 28, 29, 31, 44, 61, 64). Bei den von uns untersuchten Patienten mit einer Lymphogranulomatose oder einer chronischen lymphatischen Leukämie fand sich eine deutlich herabgesetzte Stimulierbarkeit der Blutlymphozyten durch Zn^{2+} im Vergleich mit einem gesunden Kontrollkollektiv.

Die Ätiologie des bei der Lymphogranulomatose bestehenden Immundefektes ist bis heute noch ungeklärt. Als mögliche Ursachen für die in vitro herabgesetzte Transformationsfähigkeit der Lymphozyten sind drei Möglichkeiten denkbar. Zum einen wird vermutet, daß bei der Lymphogranulomatose eine Beeinträchtigung der Lymphozytenfunktionen aufgrund eines zellulären Defektes vorliegt (26, 28, 31). Zum anderen gibt es Hinweise dafür, daß durch eine gestörte Zirkulation und Rezirkulation der Lymphozyten der Anteil normal stimulierbarer Zellen vermindert ist (60). Schließlich könnten auch zytotoxische Eigenschaften des Patientenplasmas für die herabgesetzte Sti-

mulierbarkeit der Lymphozyten verantwortlich gemacht werden. So fanden Hersh und Irvin (29) bei Untersuchung eines großen Patientenkollektivs einige wenige Fälle, bei denen das Patientenplasma eindeutig toxische Eigenschaften hatte. Auch von Scheurlen und Mitarbeiter (62) ist berichtet worden, daß bei einigen Patienten mit Lymphogranulomatose oder malignen Tumoren im Plasma Fraktionen zu finden waren, die die Lymphozytentransformation bei gesunden Kontrollpersonen unterdrücken konnten.
Wir konnten bei den von uns untersuchten Patienten keinen Einfluß von Plasmafaktoren auf die Stimulation der Blutlymphozyten nachweisen. Die Kultivierung der Patientenlymphozyten im Plasma gesunder Versuchspersonen führte zu keiner Verbesserung der Stimulierbarkeit, während umgekehrt das Plasma von Lymphogranulomatosepatienten die Transformationsfähigkeit normaler Lymphozyten nicht beeinträchtigen konnte. Dies entspricht den Ergebnissen anderer Autoren in anderen Versuchsmodellen (28).

Die Lymphogranulomatose ist vor allen Dingen in späteren Stadien der Erkrankung durch eine Lymphopenie im peripheren Blut gekennzeichnet. Diese Lymphopenie könnte als Folge einer gestörten Lymphozytenzirkulation durch Zerstörung der normalen Lymphknotenarchitektur aufgefaßt werden (60). Diese Veränderungen würden dann zu einer Reduzierung der T-Zellen in der Peripherie führen, die durch PHA stimulierbar sind, und die verminderte Stimulierbarkeit würde so erklärt werden können.

Wir konnten jedoch in Übereinstimmung mit anderen Autoren (28)

keine Beziehung zwischen dem Ausmaß der Lymphopenie und der Stimulationsrate finden. Wie eine frühere Studie über die Kulturbedingungen bei der Zinkstimulation zeigte, besteht auch bei Normalpersonen keine Korrelation zwischen der absoluten Lymphozytenzahl im peripheren Blut und dem Einbau von ^{3}H-TdR als Parameter der DNS-Synthese (7).
Es konnte außerdem erst kürzlich nachgewiesen werden, daß keine absolute Korrelation zwischen dem Ausmaß des Lymphknotenbefalls und der Ausschwemmung der Lymphozyten in den ductus thoracicus besteht (22).

Aufgrund der bisher bekannten Untersuchungsergebnisse muß angenommen werden, daß bei der Lymphogranulomatose ein Defekt der zirkulierenden Lymphozyten vorliegt, der für die verminderte Transformationsfähigkeit verantwortlich zu machen ist. Die Ätiologie der Lymphogranulomatose und die Art der Abnormalität der Lymphozyten ist bisher noch unbekannt. Einige Beobachtungen erlauben allerdings die Spekulation, daß Veränderungen der Lymphozyten bei der Lymphogranulomatose durch ein onkogenes Agens (Virus?) hervorgerufen werden können (28).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Stimulationsfähigkeit der Lymphozyten mit Zn^{2+} bei Patienten mit Lymphogranulomatose, die sich zum Zeitpunkt der Untersuchung in Remission befanden, deutlich größer war als bei Patienten in einem aktiven Stadium der Erkrankung. Dies entspricht den Ergebnissen von Han und Sokal (25), die bei Patienten in Remission einen weitgehend normalen Stimulationsindex in PHA-stimulierten Kulturen fanden.

Diese Befunde sprechen dafür, daß der immunologische Defekt bei dieser Erkrankung - ablesbar an der Stimulierbarkeit der peripheren Lymphozyten - unter dem Einfluß einer zytostatischen oder radiologischen Therapie teilweise reversibel ist. Das Modell der stimulierten Lymphozytenkultur bei Patienten mit Lymphogranulomatose kann somit als zusätzliches diagnostisches Hilfsmittel zur Beurteilung des Verlaufs der Erkrankung dienen.

Die Befunde, die wir bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie mit Hilfe der Zinkstimulation erheben konnten, entsprechen ebenfalls den Ergebnissen anderer Untersucher mit anderen Stimulantien (13, 44, 61, 64).
Über die Ursache der verminderten Stimulierbarkeit der Blutlymphozyten besteht auch bei der chronischen lymphatischen Leukämie keine endgültige Klarheit.
Ein zellulärer Defekt kann aber auch hier als sicher gelten, zumal Plasmafaktoren keinen Einfluß auf die Transformation haben. So konnte in unseren Untersuchungen der Stimulationsindex nicht verbessert werden, wenn die Patientenzellen im Plasma gesunder Versuchspersonen inkubiert wurden, und umgekehrt hatte die Kultivierung von Normalzellen im Patientenplasma keine Verminderung der Stimulationsfähigkeit zur Folge. Neben einem zellulären Defekt scheint aber auch die Zirkulation bzw. die Rezirkulation der Lymphozyten bei der chronischen lymphatischen Leukämie gestört zu sein, wie die Untersuchungen von Binet und Mitarbeiter (14) gezeigt haben. Diese Autoren fanden eine äußerst geringe Ausschwemmung von Lympho-

zyten in den ductus thoracicus bei Patienten mit hohen peripheren Lymphozytenzahlen. Interessanterweise war die Stimulationsfähigkeit der Lymphozyten aus dem ductus thoracicus deutlich besser als im peripheren Blut.

Kinetische Untersuchungen haben in unserem Kultursystem gezeigt, daß das Maximum der Zinkstimulation bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie ebenso wie bei Normalpersonen immer zwischen dem 5. und 7. Tag liegt. Auch bei einer längeren Kulturdauer (bis zu 10 Tagen) konnte die Stimulationsrate nicht verbessert werden. Dies steht im Gegensatz zu Untersuchungen anderer Autoren, die bei Verwendung von PHA eine zweigipfelige Kurve erhielten mit einem kleineren Gipfel nach 72 Stunden und einer höheren Stimulation nach 144 Stunden Kulturdauer (27, 57).

Dieser zweigipfelige Kurvenverlauf wurde von verschiedenen Seiten als Beweis dafür gedeutet, daß bei der chronischen lymphatischen Leukämie neben der leukotischen Zellpopulation noch eine normal reagierende Lymphozytenpopulation vorhanden ist. Andere Autoren allerdings lehnen dies ab (60).

Von verschiedenen Untersuchern konnte ferner gezeigt werden, daß Fälle mit niedriger peripherer Lymphozytenzahl eine höhere Stimulation aufweisen als Patienten mit einer hohen Blutlymphozytose (13, 21, 44). Es wurde daraus der Schluß gezogen, daß bei niedrigen peripheren Lymphozytenzahlen der Anteil normaler, zur Transformation befähigter Lymphozyten höher ist als bei hohen peripheren Zellzahlen.

Wir haben im Hinblick darauf in einer Serie von Experimenten durch Erhöhung der Zellzahl im Kulturansatz versucht, den

absoluten Anteil normaler Zellen zu steigern. Es gelang so auch, die Stimulationsrate deutlich zu verbessern, und zwar bei Zelldichten, die in Kulturen normaler Versuchspersonen bereits zu suboptimalen Ergebnissen führten. Dieser Befund spricht ebenfalls für die Annahme zweier Zellpopulationen bei der chronischen lymphatischen Leukämie.

Neuere Untersuchungsergebnisse könnten eine Erklärung für die reduzierte Lymphozytentransformation bei der chronischen lymphatischen Leukämie sein. Es ist mehrfach gezeigt worden, daß die leukotische Zellpopulation aus Zellen aufgebaut ist, die Charakteristika von B-Lymphozyten aufweisen (4, 47). Mit Hilfe der Immunfluoreszens ist es möglich, an den Oberflächen der überwiegenden Zahl der Zellen im peripheren Blut Immunglobuline nachzuweisen, was allgemein als eine Eigenschaft der B-Zellen gilt. Andererseits kann es als sicher gelten, daß PHA ebenso wie die meisten anderen bisher bekannten Stimulantien ausschließlich in der Lage ist, T-Zellen zu transformieren (32).

Wenn die Zellen der chronischen lymphatischen Leukämie hauptsächlich der B-Zellen-Population angehören, könnte die verminderte Transformationsfähigkeit in vitro durch PHA aufgrund der geringen Anzahl von normal reagierenden T-Lymphozyten erklärt werden.

Eine morphologische Unterscheidung der leukotischen von der normalen Lymphozytenpopulation ist bisher noch nicht gelungen. Untersuchungen einiger Autoren haben jedoch gezeigt, daß die Lymphozyten aufgrund ihrer unterschiedlichen spezifischen

Dichte in Subpopulationen aufzutrennen sind (6, 8, 19, 38, 55). Häufig angewandt wird der Albumindichtegradient, der eine Fraktionierung der Lymphozyten in Klassen unterschiedlicher Dichte bei erhaltener Vitalität zuläßt (1, 35, 53, 55). Unsere Ergebnisse haben gezeigt, daß mit Hilfe des Dichtegradienten bei Normalpersonen keine Verbesserung der Stimulation einer bestimmten Subpopulation zu erkennen ist. Hingegen erbrachte die Auftrennung der Lymphozyten von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie Zellpopulationen, die deutlich höhere Stimulationsraten aufwiesen als die Gesamtpopulation. Ähnliche Befunde haben Rieber und Mitarbeiter an Knochenmarkssuspensionen von CLL-Patienten erheben können (54). Dennoch erreicht die DNS-Synthese bei weitem nicht die Größe wie in Lymphozytenkulturen von gesunden Versuchspersonen.

5 Zusammenfassung

Die Transformationsfähigkeit der Blutlymphozyten von Patienten mit Lymphogranulomatose war in unserem Modell der Zn^{2+}-stimulierten Lymphozytenkultur verglichen mit einem Kontrollkollektiv gesunder Versuchspersonen deutlich erniedrigt. Dies zeigt sich sowohl bei der Messung des ^{3}H-Thymidin-Einbaus als auch bei der Bestimmung des Prozentsatzes blastenähnlicher Zellen. Bei Patienten, die sich in Remission befanden, lag die Stimulation höher als bei Patienten in einem aktiven Stadium der Erkrankung. Eine Abhängigkeit der Zinkstimulation von der bei vielen Patienten mit Lymphogranulomatose bestehenden Lymphopenie konnten wir bei den von uns untersuchten Patienten nicht feststellen.

Die Unterschiede in der Transformationsfähigkeit der Lymphozyten bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie waren im Vergleich zum Normalkollektiv noch größer als bei den Lymphogranulomatosepatienten. Der ^{3}H-TdR-Einbau und der Prozentsatz blastenähnlicher Zellen waren in Zinkkulturen kaum höher als in unbehandelten Kontrollkulturen. Durch Erhöhung der Zellzahl im Kulturansatz konnte die Stimulation bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie gesteigert werden. Eine Verbesserung der Transformationsfähigkeit durch Verlängerung der Kulturdauer konnte nicht erreicht werden.

Die Fraktionierung der Patientenlymphozyten über einen diskontinuierlichen Albumin-Dichtegradienten führte zu Subpopulationen, in denen die PHA-reagierenden Lymphozyten angereichert waren. Eine Auftrennung peripherer Lymphozyten von Normalper-

sonen dagegen erbrachte keine Zellpopulation, die erheblich besser stimulierbar war als die Gesamtpopulation.

Bei beiden untersuchten Krankheiten scheinen zelluläre Defekte für die verminderte Stimulierbarkeit der Lymphozyten verantwortlich zu sein. Die Stimulationsfähigkeit konnte weder bei Lymphogranulomatosepatienten noch bei Patienten mit einer chronischen lymphatischen Leukämie gesteigert werden, wenn die Lymphozyten statt im autologen Plasma im Plasma gesunder Personen kultiviert wurden.

6 Literaturverzeichnis

1. ADLER, W.'H., Peavy, D. and Smith, R. T.:

The effect of PHA, PPD, allogeneic cells, and sheep erythrocytes on albumin gradient-fractionated mouse spleen cell populations.

Cell. Immunol. 1, 78 (1970)

2. AISENBERG, A. C.:

Studies on delayed hypersensitivity in Hodgkin's disease.

J. clin. Invest. 41, 1964 (1972)

3. AISENBERG, A. C.:

Lymphopenia in Hodgkin's disease.

Blood 25, 1037 (1965)

4. AISENBERG, A. C. and Bloch, K. J.:

Immunoglobulins on the surface of neoplastic lymphocytes.

New Engl. J. Med. 287, 272 (1972)

5. ALFORD, R. H.:

Metal cation requirements for phytohemagglutinin induced transformation of human peripheral blood lymphocytes.

J. Immunol. 104, 698 (1970)

6. AMATO, D., Cowan, D. H. and McCulloch, E. A.:

Separation of immunocompetent cells from human and mouse hemopoietic cell suspension by velocity sedimentation.

Blood 39, 472 (1972)

7. AUTHERIED, G.:

Untersuchungen zur Stimulation menschlicher peripherer Lymphozytenkulturen durch Zn^{2+}.

Inaugural-Dissertation, Freie Universität Berlin (1971)

8. BACH, M. K. and Brashler, J. R.:

Isolation of subpopulations of lymphocytic cells by the use of isotonically balanced solution of Ficoll.

Exp. Cell Res. 61, 387 (1970)

9. BAIN, B., Vas, M. R. and Lowenstein, L.:

The development of large immature mononuclear cells in mixed leucocyte cultures.

Blood 23, 108 (1964)

10. BAIN, B., Lowenstein, L. and McLean, L. D.:

The in vitro mixed leucocyte reaction and initial studies in its application as a test for histocompatibility.

In: Histocompatibility testing, Washington, National Academy of Sciences - National Research Council 1229, 179 (1965)

11. BARKER, B. E. and Farnes, P.:

Mitogenic property of Wistaria floribunda seeds.

Nature 215, 659 (1967)

12. BARKER, B. E. and Farnes, P.:

Histochemistry of blood cells treated with Pokeweed mitogen.

Nature 214, 787 (1967)

13. BERNARD, C., Geraldes, A. and Boiron, M.:

Effects of phytohemagglutinin on blood-cultures of chronic lymphocytic leukaemias.

Lancet i, 667 (1964)

14. BINET, J. L., Villeneuve, B., Becart, R. et al.:

Temps de passage dans le canal thoracique des lymphocytes du sang de la leucémie lymphoide chronique.

Nouv. Rev. Franc. Hemat. 7, 621 (1967)

15. BRANDT, L., Börjeson, J., Norden, A. and Olsson, I.:

Separation of lymphocytes from peripheral blood by means of a glass wool column.

Acta med. scand. 172, 459 (1962)

16. CEROTTINI, J. C., Nordin, A. A. and Brunner, K. T.:

Specific in vitro cytotoxicity of thymus-derived lymphocytes sensitized to alloantigens.

Nature 228, 1308 (1970)

17. CLAMAN, H. N. and Chaperon, E. A.:

Immunological complementation between thymus and marrow cells - a model for the two cell theory of immunocompetence.

Transplant. Rev. 1, 92 (1969)

18. DAVIS, A. J. S.:

The thymus and the cellular basis of immunity.

Transplant. Rev. 1, 43 (1969)

19. EDELMAN, G. M., Rutishauser, U. and Millette, C. F.:

Cell fractionation and arrangement on fibers, beads, and surfaces.

Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 2153 (1971)

20. ELVES, M. W., Roath, S. and Israels, M. C. G.:

The response of lymphocytes to antigen challenge in vitro.

Lancet I, 806 (1963)

21. ELVES, M. W., Collinge, M. and Israels, M. C. G.:

The potential of lymphocytes from patients with leukemia and reticuloses to transform under the influence of phytohemagglutinin.

Acta haemat. 37, 100 (1967)

22. ENGESET, A., Cooper, E. H., Brennhovd, I. and Hoeg, K.:

The thoracic duct lymph in Hodgkin's disease. II. Quantitative analysis of the cellular composition of the lymph.

Int. J. Cancer 8, 113 (1971)

23. GOOD, R. A.:

Progress towards a cellular engineering.

J. Am. Med. Assoc. 214, 1389 (1970)

24. GOWANS, J. L. and McGregor, D. D.:

The immunological activities of lymphocytes.

Progr. Allergy 9, 1 (1965)

25. HAN, T. and Sokal, J. E.:

Lymphocyte response to phytohemagglutinin in Hodgkin's disease.

Amer. J. Med. 48, 728 (1970)

26. HAVEMANN, K. und Schmidt, M.:

Lymphozytenkulturen bei Hodgkinscher Erkrankung: Hinweise für zwei Lymphozytenpopulationen mit unterschiedlicher Reaktion auf Phytohämagglutinin (PHA).

Klin. Wschr. 46, 31 (1968)

27. HAVEMANN, K. and Rubin, A. D.:

The delayed response of chronic lymphocytic leukemia lymphocytes to phytohemagglutinin in vitro.

Proc. Soc. exp. Biol. 127, 668 (1968)

28. HERSH, E. M. and Oppenheim, J. J.:

Impaired in vitro lymphocyte transformation in Hodgkin's disease.

New Engl. J. Med. 273, 1006 (1965)

29. HERSH, E. M. and Irvin, W. S.:

Blastogenic response of lymphocytes from patients with treated and untreated lymphomas.

Lymphology 2, 150 (1969)

30. HIRSCHHORN, K., Schreibmann, R. R., Bach, F. H. and Siltzbach, L. E.:

In vitro studies of lymphocytes from patients with sarcoidosis and lymphoproliferative diseases.

Lancet ii, 842 (1964)

31. JACKSON, S. M., Garrett, J. V., Path, F. C. and Craig, A. W.:

Lymphocyte transformation changes during the clinical course of Hodgkin's disease.

Cancer 25, 843 (1970)

32. JANOSSY, G. and Greaves, M. F.:

Lymphocyte activation. I. Response of T and B lymphocytes to phytomitogens.

Clin. Exp. Immunol. 9, 483 (1971)

33. KATZ, D. H. and Benacerraf, B.:

The regulatory influence of activated T cells on B cell response to antigen.

Adv. Immunol. 15, 1 (1972)

34. KELLY, W. D., Lamb, D. L., Varco, R. L. and Good, R. A.:

An investigation of Hodgkin's disease with respect to the problem of homotransplantation.

Ann. N. Y. Acad. Sci. 87, 187 (1960)

35. KINOSHITA, Y., Kimura, S., Takeshita, T., Kimura, E., Yukioka, M. and Morisawa, S.:

Isolation of heterogenous lymphocytes according to their cellular densities by multilayer centrifugation and detection of the seperated fraction containing the immunological memory cells.

Exp. Cell Res. 59, 299 (1970)

36. KIRCHNER, H., Altman, L. C., Blaese, R. M. and Oppenheim, J. J.:

Studies of in vitro lymphocyte transformation and lymphokine production in agammaglobulinemic chickens.

Vierte Arbeitstagung über Leukozytenkulturen, Innsbruck, Austria (1973)

37. KIRCHNER, H. and Rühl, H.:

Stimulation of human peripheral lymphocytes by Zn^{2+} in vitro.

Exp. Cell Res. 61, 229 (1970)

38. LEIF, R. C. and Vinograd, J.:

The distribution of buoyant density of human erythrocytes in bovine albumin solutions.

Proc. Nat. Acad. Sci. 51, 520 (1964)

39. LING, N. R.:

Lymphocyte stimulation.

North Holland Publishing Comp., Amsterdam (1968)

40. MILLER, J. F. A. P. and Osoba, D.:

Current concepts of the immunological function of the thymus.

Physiol. Rev. 47, 437 (1967)

41. MILLER, J. F. A. P.:

Interaction between T-cells and B-cells in humoral antibody responses.

Adv. Exp. Med. Biol. 12 (Ed. K. Lindahl-Kiessling, G. Alm and M. G. Hanna), 93 (1971)

42. NASPITZ, C. K. and Richter, M.:

The action of phytohemagglutinin in vivo and in vitro, a review.

Prog. Allergy 12, 1 (1968)

43. NOWELL, P. C.:

Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes.

Cancer Res. 20, 462 (1960)

44. OPPENHEIM, J. J., Whang, J. and Frei, E.:

Immunologic and cytogenic studies of chronic lymphocytic leukemia cells.

Blood 26, 121 (1965)

45. OPPENHEIM, J. J., Leventhal, B. G. and Hersh, E. M.:

Transformation of column-purified lymphocytes with nonspecific and specific antigenic stimuli.

J. Immunol. 101, 262 (1968)

46. PEARMAIN, G., Lycette, R. R. and Fitzgerald, P. H.:

Tuberculin-induced mitosis in peripheral blood leucocytes.

Lancet I, 637 (1963)

47. PERNIS, B., Ferrarini, M., Formi, L. and Amante, L.:

Immunoglobulins on lymphocyte membranes.

In: Progress in Immunology (Ed. D. B. Amos), Academic Press, New York, 95 (1971)

48. POLLIACK, A., Lampen, N., Clarkson, B. D., De Harven, E., Bentwich, Z., Siegal, F. P. and Kunkel, H. G.:

Identification of human B and T lymphocytes by scanning electron microscopy.

J. Exp. Med. 138, 607 (1973)

49. POWELL, A. E. and Leon, M. A.:

Reversible interaction of human lymphocytes with the mitogen Concanavalin A.

Exp. Cell Res. 62, 315 (1970)

50. PRASAD, A. S. and Oberleas, D.:

Zinc: human nutrition and metabolic effects review.

Ann. Int. Med. 73, 631 (1970)

51. RABINOWITZ, Y.:

Separation of lymphocytes, polymorphonuclear leucocytes and monocytes on glass columns including tissue culture observations.

Blood 23, 811 (1964)

52. RAFF, M. C.:

Surface antigenic markers for distinguishing T and B lymphocytes in mice.

Transplant. Rev. 6, 52 (1971)

53. RAIDT, D. J., Mishell, R. I. and Dutton, R. W.:

Cellular events in the immune response. Analysis and in vitro response of mouse spleen cell populations separated by differential flotation in albumin gradients.

J. Exp. Med. 128, 681 (1968)

54. RIEBER, E. P., Riethmüller, G. und Riethmüller, D.:

Weitere Untersuchungen zur Auftrennung humaner Lymphozyten in verschiedene Dichteklassen und ihre Transformation in vitro.

In: Leukozytenkulturen, Hrsg. G. Brittinger und H. J. Roggenbach, Schattauer Verlag, 87 (1971)

55. RIETHMÜLLER, G., Rieber, E. P. and Riethmüller, D.:

Untersuchungen zur Heterogenität humaner Lymphozyten: Trennung peripherer Lymphozyten im Albumindichtegradienten und Untersuchung der einzelnen Zellpopulationen auf ihre proliferative Reaktion in vitro.

Klin. Wschr. 48, 1343 (1970)

56. ROBBINS, J. H.:

Human peripheral blood in tissue culture and the action of phytohemagglutinin.

Experientia 20, 1 (1964)

57. ROBBINS, J. H. and Levis, W. R.:

Inherent inability of chronic lymphocytic leukemia lymphocytes to respond to phytohemagglutinin.

Int. Arch. Allergy 43, 845 (1972)

58. ROSENBERG, S. A.:

Report of the committee on the staging of Hodgkin's disease.

Cancer Res. 26, 1310 (1966)

59. RÜHL, H., Kirchner, H. and Bochert, G.:

Kinetics of the Zn^{2+}-stimulation of human peripheral lymphocytes in vitro.

Proc. Soc. exp. Biol. 137, 1089 (1971)

60. RUBIN, A. D.:

In vitro evaluation of lymphocyte proliferation in lymphoproliferative disorders.

Proc. of the fifth leucocyte culture conference (Ed. J. E. Harris). Academic Press, 239 (1970)

61. RUBIN, A. D., Havemann, K. and Dameshek, W.:

Studies in chronic lymphocytic leukemia: further studies of the proliferative abnormality of the blood lymphocyte.

Blood 33, 313 (1969)

62. SCHEURLEN, P. G., Pappas, A. und Ludwig, T.:

Stimulation der Blutlymphozyten durch Phytohämagglutinin bei chronischer Lymphadenose, Lymphosarkomatose und Lymphogranulomatose.

Klin. Wschr. 46, 483 (1968)

63. SCHÖPF, E., Schulz, K. H. und Isensee, I.:

Untersuchungen über den Lymphozytentransformationstest bei Quecksilberallergie.

Arch. klin. exp. Derm. 234, 420 (1969)

64. SCHREK, R. and Rabinowitz, Y.:

Effects of phytohemagglutinin on rat and normal and leukemic human blood cells.

Proc. Soc. exp. Biol. 113, 191 (1963)

65. SCHWEITZER, M., Melief, C. J. M. and Eijsvoogel, V. P.:

The nature of the transforming lymphocyte in chronic lymphocytic leukemia.

Eur. J. Immunol. 3, 121 (1973)

66. TURK, A., Glade, P. R. and Chessin, L. N.:

Blast-like transformation induced in peripheral blood lymphocytes by cellular injury: a comparision of sonication and phytohemagglutinin.

Blood 33, 329 (1969)

67. WEGENER, W. S., and Romano, A. H.:

Zinc stimulation of RNA and protein synthesis in rhizopus nigricans.

Science 142, 1669 (1963)

68. WESER, U., Seeber, S. und Warnecke, P.:

Zur Wirkung von Zn^{2+} auf die Nukleinsäurebiosynthese von Ascites-Tumorzellen.

Experientia 25, 489 (1969)

69. WILSON, J. D. and Nossal, G. J. V.:

Identification of human T and B lymphocytes in normal peripheral blood and in chronic lymphocytic leukaemia.

Lancet, October 9, 788 (1971)

70. YOFFEY, J. M.:

The present status of the lymphocyte problem.

Lancet I, 206 (1962)

71. YOFFEY, J. M., Winter, G. C. B., Osmond, D. G. and Meek, E. S.:

Morphological studies in the culture of human leucocytes with phytohaemagglutinin.

Brit. J. Haemat. 11, 488 (1965)

Ich danke Herrn Professor Dr. H. Brücher und Herrn Dr. H. Rühl für die Überlassung des Themas und für die wertvolle Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.
Bei Frau G. Bochert bedanke ich mich für die ausgezeichnete technische Assistenz.

Lebenslauf

Am 30. Mai 1948 wurde ich als Sohn des damaligen Staatsanwaltes und heutigen Stadtrats Karl Scholle und dessen Ehefrau Liese-Lotte Scholle, geborene Jordan, in Berlin geboren. Meine Mutter verstarb am 20. Januar 1963.

Von 1954 bis 1960 besuchte ich die 5. Grundschule in Berlin-Reinickendorf. Am Berliner Lessing-Gymnasium bestand ich am 24. 2. 1967 die Reifeprüfung. Meine Ausbildung setzte ich mit meiner Immatrikulation an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin im Sommersemester 1967 fort. Die naturwissenschaftliche Vorprüfung legte ich im Frühjahr 1968 ab. Am 8. 10. 1969 bestand ich das Physikum. Im Sommer 1970 studierte ich ein Semester an der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen. Während des weiteren klinischen Studiums in Berlin befaßte ich mich mit experimentellen Fragen der zellgebundenen Immunität in der Hämatologischen Abteilung des Klinikum Steglitz. Am 15. Februar 1973 bestand ich die ärztliche Staatsprüfung.